

ARTICULO ORIGINAL

Comparación de la respuesta de ratas Sprague Dawley frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide.**Comparison of the Sprague Dawley rat's response against cyclophosphamide and bleomycin in the head sperm morphology assay.****Arencibia Arrebola DF^{1*}, Vidal Novoa A², Rosario Fernández LA³, Delgado Roche L⁴**¹Departamento de Modelos Animales y Toxicología Preclínica, Instituto Finlay²Facultad de Biología (U.H)³Departamento de Microbiología, Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H)⁴Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana

Avd 17 e/ 198 y 200, Reparto Atabey, Municipio Playa, código postal 16017, Ciudad de la Habana, Cuba.

Teléfono: 072716911

*darencibia@finlay.edu.cu

RESUMEN

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide permite el estudio del potencial genotóxico de muestras problemas a nivel celular, esta herramienta evalúa los cambios efectuados en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales. En este artículo decidimos evaluar y comparar en el biomodelo de ratas Sprague Dawley machos, el efecto de dos sustancias mutagénicas en este ensayo, la Ciclofosfamida (CF) en dosis de 50 mg/kg y la Bleomicina (BL) en dosis de 30 mg/kg, administradas por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos, siendo sacrificados los animales 52 días después de la última administración de los mutágenos. Se obtuvo como resultado que ambos mutágenos disminuyeron la concentración espermática y aumentaron el índice espontáneo de cabezas anómalas en los espermatozoides, siendo observado un marcado efecto mutagénico en la CF en comparación con la BL. Al final de la experiencia se obtuvieron mayores resultados de inducción de cabezas de espermatozoides anómalas con el uso de la CF. Estos resultados reafirman el uso de este mutágeno como control positivo eficiente y seguro en este ensayo el cual se encuentra incluido en los estudios de genotoxicidad y toxicología de la fertilidad.

PALABRAS CLAVE: Bleomicina, ciclofosfamida, ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, inducción, ratas Sprague Dawley.

ABSTRACT

The head sperm morphology assay, allows the study of the genotoxic potential of samples at the cellular level problems; this tool to evaluate the spermatic concentration changes, as well as the increase of the spontaneous heads frequency of sperms morphology abnormal. In this article we decide to evaluate and to compare in the Sprague Dawley males rats, the effect of two mutagenic substances in these assay, the Cyclophosphamide, (CF) in dose of 50 mg/kg and the Bleomycin (BL) in dose of 30 mg/kg, administered by intraperitoneal route during 5 consecutive days, being sacrificed the animals 52 days after the last administration of the mutagens. It was obtained that both mutagen diminished the spermatic concentration and they increased the spontaneous index of anomalous sperms heads, being observed a marked mutagenic effect in the CF in comparison with the BL. At the end of the experience bigger results of induction of anomalous heads sperms were obtained with the use of the CF. These results reaffirm the use of this mutagen as efficient and safe positive control in this assay which is included in the genotoxicity studies and fertility toxicology.

Fecha de recepción (Date received): 07-06-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10- 08-2010

Ars Pharm, 2010, Vol. 51 n°3; 155-162.

KEYWORDS: Bleomycin, cyclophosphamide, head sperm morphology assay, induction, Sprague Dawley rats.

INTRODUCCION

El ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide se encuentra dentro de la batería de ensayos de genotoxicidad, el cual permite determinar la inducción de daño a nivel de las células germinales masculinas y en ocasiones se recomienda incluir dentro de estudios toxicológicos de larga duración en los cuales la sustancia a investigar se administre por períodos superiores a un ciclo espermático completo.

Esta técnica es sensible, rápida y económica lo cual justifica su uso. Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, estos criterios permiten el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoide al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas.¹

Esta herramienta a su vez permite evaluar cambios en la concentración espermática, siendo capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo.²

Una ventaja importante de este sistema de ensayo es la posibilidad que brinda de poder comparar los resultados experimentales obtenidos en humanos y mamíferos expuestos a los mismos compuestos, lo cual resulta prácticamente imposible con otras metodologías, otorgándole un considerable valor predictivo.³

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia basal e inducida de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética, para de esta forma darnos cuenta que estamos frente a una sustancia mutagénica y/o genotóxica, y así corroborar la existencia o no de un efecto mutagénico y en que medida se manifiesta, además al ser estas pruebas tan decisivas en la evolución positiva o negativa de un nuevo producto de índoles diversas es necesario buscar el biomodelo animal ideal.

Dentro de las sustancias utilizadas como control positivo en los ensayos *in vivo* se encuentran la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL). Estos antineoplásicos son utilizados en los estudios de genotoxicidad en dosis y diseños diferentes, por lo cual no existe una armonización establecida en estos ensayos, que tenga en cuenta el tiempo, dosis y frecuencia utilizada.

Dado lo expuesto, en este artículo decidimos evaluar y comparar, usando el biomodelo de ratas Sprague Dawley machos, el efecto de dos sustancias mutagénicas, CF y BL; administradas por vía intraperitoneal (i.p), durante 5 días consecutivos, en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, útil como ensayo de genotoxicidad y como ensayo para determinar la fertilidad del macho.

Materiales y Métodos

Animales. Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos, adultos jóvenes (6-8 semanas), procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal oscilaba entre 170-200 g al término de la cuarentena (7 días), durante la cual los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio. La temperatura se mantuvo en $25 \pm 3^\circ\text{C}$, la humedad entre $60 \pm 10\%$ y los ciclos de luz- oscuridad fueron de 12 horas. El alimento administrado a los animales durante toda la experiencia fue pienso estándar para esta especie preparado en el CENPALAB. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba en internacionales, así como a partir de los procedimientos establecidos en nuestro instituto.

Administración y dosificación. En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (10 ratas/grupo), para un total de 20 ratas/grupo en las dos réplicas realizadas.

En el grupo experimental 1 utilizamos como control negativo el (NaCl) al 0,9 % administrado por vía oral en dosis de 2 ml/kg, durante un periodo de 52 días, tiempo que coincide con la duración del ciclo espermático en la rata, preparado 2 horas antes de su uso.² En el grupo experimental 2 utilizamos como sustancia de referencia 1, la CF en dosis de 50 mg/kg^{2,4} y en el grupo experimental 3 utilizamos como sustancia de referencia 2, la BL en dosis de 30 mg/kg, dosis algo más baja que la reportada en ratones,⁵ ya que las ratas son más susceptibles al daño sistémico de la BL.⁶ Ambas sustancias se diluyeron en disolución salina (NaCl) al 0,9 % y fueron administradas a razón de 10 ml/kg, por vía i.p.. Se administraron inmediatamente de preparadas durante 5 días consecutivos y luego estuvieron sin administrarse 52 días.²

Observaciones clínicas. Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, incluyendo la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

Sacrificio. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en previa atmósfera de éter. En el caso del grupo experimental 1 a las 24 horas de la última administración y en los grupos 2 y 3, el sacrificio fue a las 24 horas pasados los 52 días de reposo, para que los espermatozoides analizados fuesen los que estuvieron expuestos a las sustancias mutagénicas.⁷

Ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide:

Se realizó la extracción de un solo epidídimo, posteriormente se redujo a pequeños fragmentos, siendo depositado en placas Petri que contenían 3 ml de solución isotónica de

NaCl 0,9 %. La muestra se homogenizó con pipetas Pasteur.⁸

Conteo de espermatozoides. El contenido de la placa se colocó en un tubo graduado, al cual se le añadió previamente 0,05 ml de tripsina al 0,25 %, transcurridos cinco minutos de tripsinización se le añadió 2 mL más de NaCl 0,9 %, luego se realizó una dilución del homogeneizado tripsinizado en NaCl - Formol al 1 % (1:10) y se colocó en una cámara de Neubauer, contándose ambos lados de la cámara al microscopio Olympus BH-2.^{9, 10}

Morfología del espermatozoide. Al tubo que contenía la dilución del homogeneizado ya diluido se le añadió cinco gotas de eosina al 1 %, dejándolo reposar por cinco minutos. Posteriormente, se extendió una gota sobre una lámina seca y se colocó el cubreobjeto.⁸ Se prepararon dos láminas por animal y se analizaron 500 espermatozoides, las observaciones fueron realizadas “a ciegas” por dos observadores independientes para luego establecer un promedio entre ambos. El criterio de clasificación se basó en cabezas normales y anormales que incluye amorfas, banana, sin gancho y con dos colas.^{9, 11}

Análisis estadístico. Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por lo cual todos los resultados se analizaron mediante el método de análisis de varianza (ANOVA).⁸ El nivel de significación, establecido fue α 0.05. Todos los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico Statsoft for windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales controles negativos y los administrados con CF y BL, tanto en los resultados de la concentración espermática como en los del ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, siendo observados en las tablas 1 y 2. Se corroboró que el rango espontáneo de la concentración espermática en esta especie se encuentra entre $2,27 \pm 0,4 \times 10^6$ células/ml y el número de cabezas anómalas esta entre $43,0 \pm 6,6$ en 500 células registradas, por su parte la CF disminuyó considerablemente la concentración con valores entre $0,79 \pm 0,2 \times 10^6$ células/ml y un número de cabezas anómalas entre $98,1 \pm 2,0$ igualmente en 500 células registradas, en tanto en la BL se obtuvieron valores como promedio en la concentración espermática en las dos series experimentales de entre $1,35 \pm 0,4 \times 10^6$ células/ml y $68,4 \pm 4,3$ número de espermatozoides con cabezas anómalas.

Así mismo los resultados obtenidos en los animales tratados con CF difirieron significativamente con los obtenidos en los animales tratados con BL, al realizar una comparación entre mutágenos en ambos tipos de mediciones tanto en los parámetros de citotoxicidad como de genotoxicidad.

Tabla 1. Concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer frente a ciclofosfamida y bleomicina en ratas Sprague Dawley.

Grupo	n	Promedio de espermatozoides/cuadro	Concentración* (10 ⁶) células/mL.
Control negativo (NaCl, 0,9 %)	20	45,2 ± 2,8	2,27 ± 0,4
Ciclofosfamida (50 mg/kg)*	20	15,8 ± 2,9 ^{ab}	0,79 ± 0,2 ^{ab}
Bleomicina (30 mg/kg)*	20	26,8 ± 3,4 ^a	1,35 ± 0,4 ^a

*Administración por vía i.p, durante 5 días. ^a p<0.05 (comparación con el control negativo, ANOVA), ^b p<0.05 (comparación entre mutágenos, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

Tabla 2. Efecto de la ciclofosfamida y bleomicina sobre la morfología de la cabeza del espermatozoide utilizando ratas Sprague Dawley como biomodelo.

Grupo	n	Normales	Anormales	Amorfos	Bananas	Sin Gancho	Dos Colas
CN	20	457,0±11,2	43,0±6,6	15,0±2,6	12,1±6,4	14,9±5,5	1,0±0,6
CF*	20	401,9±13,1 ^{ab}	98,1±2,0 ^a b	25,1±5,3 ^{ab}	33,5±1,2 ^{ab}	35,0±3,1 ^a b	4,5±0,5 ^a b
BL*	20	431,6±17,5 ^a	68,4±4,3 ^a	19,2±3,7 ^a	24,0±2,3 ^a	21,8±4,6 ^a	3,4±0,3 ^a

(CN: Control negativo NaCl 0,9 %, CF: Ciclofosfamida 50 mg/kg, BL: Bleomicina 30 mg/kg). *Administración por vía i.p, durante 5 días.

Determinaciones en 500 células/animal. ^a p<0,05 (comparación con el control negativo, ANOVA), ^b p<0.05 (comparación entre mutágenos, ANOVA). (X media; DE desviación estándar, para las dos series analizadas).

Discusión.

No se observaron síntomas clínicos indicativos de toxicidad en ninguno de los tres grupos experimentales incluidos en este estudio durante el transcurso de esta experiencia en las dos series experimentales. Indicando que las dosis utilizadas en cada uno de estos mutágenos no fueron tóxicas a nivel sistémico, si siendo susceptibles las células dianas

obtenidas y evaluadas mediante este ensayo.^{2, 4, 8,9}

Utilizamos un grupo control negativo (NaCl al 0,9 %), para corroborar los resultados de inducción obtenidos con el uso de ambas sustancias mutagénicas, estos resultados concuerdan con los hallados por nosotros en animales tratados con el NaCl al 0,9 % y con el uso de la CF como mutágeno en este ensayo tanto en ratas como en ratones.^{2, 4,12}

Al comparar los resultados entre mutágenos se pudo observar una mayor tendencia a disminuir esta variable por parte de la CF en la cual se obtuvieron rangos más bajos de concentración espermática y en el número de espermatozoides con cabezas normales. Estos resultados concuerdan con varios autores que plantean que la CF es un mutágeno que crea metabolitos activos que logran interactuar con las células de Sertoli y directamente con las células germinales, disminuyendo la producción y maduración de estas.¹³⁻¹⁶

Por otro lado analizando los resultados obtenidos en cuanto a la morfología de la cabeza del espermatozoide al comparar la respuesta entre mutágenos, se observa que nuevamente la CF fue capaz de inducir mayor número de cabezas morfológicamente anómalas, resultados que están en conjunción con los hallados en la determinación de la concentración espermática en epidídimos, según como hemos reportado nosotros la acción de este mutágeno químico tanto en ratas como en ratones usadas como biomodelos en este ensayo,^{2,4,12} a su vez BL demostró menor acción mutagénica sobre la concentración espermática y la morfología de la cabeza de las espermatogonias, lo cual no descarta su efecto encontrado sobre la disminución considerable en la concentración espermática en conjunción con una disminución reportada de la fertilidad.¹⁷

Los resultados bajos obtenidos con BL demuestran una vez más la mayor implementación del uso de la CF en este ensayo como mutágeno altamente inductor de cabezas de espermatozoides anómalas, ya que el mayor efecto reportado por BL, esta dado por la inducción de labilidad de la estructura del ADN y ruptura del mismo al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres, resultados por los cuales se ha utilizado con gran éxito como control positivo en los ensayos de cometa y en estudios sobre estrés oxidativo.^{18,19}

A su vez se aprecia en la tabla 2 que se obtuvo en mayor proporción la aparición de espermatozoides en forma de banana y sin gancho en la inducción con CF, justificando el uso de CF como control positivo en estudios de teratogénesis y fertilidad,²⁰⁻²³ ocasionando el aumento de estas formas anómalas que impiden realizar la fecundación con efectividad, así como trae consigo la formación de un nuevo individuo con malformaciones con posible transmisión a la descendencia, en cuanto a BL en mayor número se obtuvo la aparición de espermatozoides en forma de banana.

Se logró con ambos mutágenos un ambiente genotóxico en el biomodelo rata Sprague Dawley macho, resultado que podría utilizarse en la evaluación de drogas con carácter antígenotóxico a nivel de células germinales como sistema inductor de daño significativo;

vinculándose este ensayo de forma directa a fertilidad y teratogénesis.

El hecho de ser la CF más barata y de significar menor riesgo para el personal involucrado en el trabajo con esta sustancia mutagénica al ser comparado con BL,²⁴ y que la CF haya inducido mayor daño, permite deducir la importancia de los resultados obtenidos en este trabajo.

Conclusiones

Se concluyó que ambos mutágenos pueden ser utilizados como controles positivos en este ensayo de genotoxicidad. Al final de la experiencia se obtuvieron mayores resultados de inducción de cabezas de espermatozoides anómalas con el uso de CF, administrada durante 5 días consecutivos en dosis de 50 mg/kg por vía i.p en comparación con BL. Estos resultados reafirman el uso de este mutágeno como control positivo eficiente y seguro en este ensayo el cual se encuentra incluido en los estudios de genotoxicidad y toxicología de la fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wyrobek AJ. An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res* 1983; 115(3):73-148.
2. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratas Sprague Dawley. *Rev Tox* 2009; 26(1):47-50.
3. Fielder RJ, Allen JA, Boobis AR, Botham PA, Doe J, Esdaile DJ. Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in "In Vivo" Mutagenicity Assays. *Gen Tox and Environ Mut* 1999; 4(3):313-9.
4. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. *Retel* 2009; 20(1):2-14.
5. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cub Invest Biomed* 2001; 20(1):48-53.
6. Díaz S, González I, González R, Coll F. Evaluación antígenotóxica in vivo de un análogo de brasinosteroide. *Rev Cub Farm* 2008; 42(Sup Esp 3):75-6.
7. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 2009; 23(3):23-40.
8. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel* 2009; 25(3):22-38.
9. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical Mutagens "Principles and Methods for their detection". En: Wyrobek and Bruce edition. United Kingdom, England: UK Published Edition; 1978.p.135-6.
10. Kempinas WG, Lamano-Carvalho TL. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat caudal epididymidis. *Lab Anim* 1998; 22:154-6.
11. Schardein JL. Reproductive Hazards. En: Product Safety Evaluation Handbook. New York, USA: Marcel Dekker Inc Edition. Second Edition; 1999.p.299-333.

12. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb-C y OF-1. *Retel* 2009; 24(2):7-29.
13. Johnson J. Administration backs chemical testing, *Genetic Toxicology in germinal cells. Chem Eng News* 1998, 76:7-8.
14. Domínguez A, Tamayo M, Pérez I, Salas H, Pérez O, Batista A. Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFO1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor* 2009; 18(3):13-7.
15. Betancourt J, Ramos A, Bizoso Á, Decalo M, Martínez MJ, Edreira A. Evaluación genotóxica del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* mill (añil cimarrón) mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides. *Rev Cub Plant Med* 1998; 3(2):58-61.
16. Arce JM. Esterilidad y control de la fecundidad. *MedCiclopedia* 2009; Septiembre 27:5-7.
17. Blomindex. Solución Inyectable Antineoplásico. En: Laboratorios Pisa, S.A. de C.V. Guadalajara, España: Número de registro y clave IPPA: Reg. Núm. 375M2000, S.S.A. GEAR-102258/RM2001/IPPA; 2007.p.1-6.
18. Mani S, Buzaid AC, Cadman EC. Pharmacology of antineoplastic agents, multidrug resistance, and the feature. En: *Hematology: basic principles and practice*, Hoffman R and collaborators, editors. New York: Churchill Livingstone editorial; 1995.p.915-40.
19. Alvarez C, Rodríguez R, Wong P, Arévalo J, Canga M, Torres R, Chang L. Nueva Alternativa en el Manejo del Craneofaringioma Sólido Quístico: Bleomicina Intracavitaria más Resección Neuroendoscópica. *Ana Facul Med* 1999; 60(4):293-7.
20. Porter A, Singh G. Trasplacentar teratogenesis and mutagenesis in Mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. *Terat, Carc, and Mutag* 1998; 8:191-203.
21. Monteiro C, Marcelino LA, Conde AR, Saraiva C, Giphart M, Dooij-van AG. Molecular Methods for the Detection of Mutations. *Terat, Carc, and Mutag* 2000; 20:357-86.
22. Kotwani A. Methods for teratogenicity testing existing and future models. *Ind Journ of Pharma* 1995; 27:204-13.
23. Guachalla L, Ascarrunz ME. La Genética Toxicología: Una ciencia en constante desarrollo. *BIOFARBO* 2003; 11:75-82.
24. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mut Res* 2010; 696:69-80.